

# STQ 法による残留農薬分析のための試料前処理法の検討

## Examination of sample preprocessing method for pesticide residue analysis by STQ method

千葉 美子 瀧澤 裕 大内 亜沙子 高橋 美保

Yoshiko CHIBA, Yu TAKIZAWA, Asako OUCHI, Miho TAKAHASHI

各種果実類を対象として、STQ 法による残留農薬分析のための試料前処理法について検討した。凍結粉砕法は、従来から実施しているミキサー法に比べ、果実の種類に関係なく一様な粉砕・均一化が可能であった。また、前処理後の試料について粒度分布を測定した結果、凍結粉砕法では一部の果実を除き果実間差はほとんど認められなかった。さらに、凍結粉砕法による試料前処理のメリットとして、コンタミネーションの防止、抽出時間の短縮及び効率化などの効果が挙げられ、同法の有効性が示された。

キーワード：凍結粉砕；粒度分布；STQ

Key words：Freeze grinding；Particle size distribution；STQ

### 1 はじめに

食品中に残留する農薬等の分析において、正確な検査結果を得るためには、試料の調製方法も重要なポイントとなる。厚生労働省公定試験法の告示法でも、検体の試験部位に対する前処理が細かく規定されているが、特に注意すべき点としては、分析に用いる分取試料が試料全体を反映するように農作物を均一化して、調製・分取する必要性が挙げられる。

これまで当所では、前処理にフードプロセッサーもしくはジューサーミキサーを使用して細切及び均一化を行ってきたが、果実や一部の野菜類など水分含量の多い作物では、均一化後、短時間で水分と固形分に分離するため、試料の分取に苦慮していた。また、外皮が厚く硬い農作物では一部の皮が粉砕されずに残るなど十分な均一化が困難となり、その都度個別に対応せざるを得ない状況であった。

このような状況の中、当所では、「食品中に残留する農薬等に関する試験法の妥当性評価」を実施するに当たり、株式会社アイスティサイエンスが開発した STQ 法：Solid Phase Extraction Technique With QuEChERS method を検討し、同法に定容操作を加えた STQ 法の改良法（以下 STQ 法）の導入を決定した。

そこで、STQ 法に適した前処理方法を検討する目的で、従前から実施していたジューサーミキサー法（以下ミキサー法）と QuEChERS 法（AOAC Official Method 2007.01：AOAC 法や European Committee for Standardization Standard Method EN 15662：CEN 法としても採用）が推奨している凍結状態で試料を均一化する予冷式ドライアイス凍結粉砕法（以下凍結粉砕法）により得られた試料を比較し、STQ 法による残留農薬分析のための有効性について検討したので報告する。

### 2 方法

#### 2.1 検体

表 1 の第 1 欄に掲げる果実のうち、県内の青果店で購入することができた 16 品目の果実類（赤字）を対象に、それぞれ同表の第 2 欄に掲げる処理を行ったものを検体とした。

#### 2.2 使用機器

ジューサーミキサー：パナソニック株式会社製

ナショナルミキサーMX-V100

粉砕器：株式会社エフ・エム・アイ製

ロボクープブリクサーBLIXER-3D

精密電子天秤：ザルトリウス・ジャパン株式会社

CP224S

粒度分布測定器：株式会社セイシン企業製

Laser Micron Sizer LMS-2000e

（宮城県産業技術総合センターの備品を借用）

電気定温乾燥器：ヤマト科学株式会社製 DK-42

#### 2.3 使用器材

CELLSTAR50ml 容 PP 製チューブ：

株式会社グライナー・ジャパン製

アルミカップ No.12：アズボン株式会社製

#### 2.4 細切均一化

それぞれの果実について、表 1 に示した処理を施した検体を四分法によりミキサー法用と凍結粉砕法用に取り分けた。

ミキサー法は、取り分けた検体を粗く細切した後、ジューサーミキサーを用いてホモジナイズした。ホモジナイズ処理の時間は果実により異なり、ミキサーの攪拌により試料の流動が認められ、目視により試料が均一化されたと判断できるまで行った。

凍結粉砕法は、取り分けた検体を細切した後、予めドライアイスと共に和えて予冷し、十分に冷却しておいた

表 1 対象果実一覧

|                           | 第 1 欄                              | 第 2 欄                          |
|---------------------------|------------------------------------|--------------------------------|
| 核果果実                      | あんず、うめ、おうとう、ずもも及びネクタリン<br>もも       | 果核及び種子を除去したもの<br>果皮及び種子を除去したもの |
| かんきつ類果実                   | オレンジ、グレープフルーツ、なつみかんの果実全体、タイム及びレモン  | 果実全体                           |
|                           | なつみかん及びみかん                         | 外果皮を除去したもの                     |
|                           | なつみかんの外果皮                          | へたを除去したもの                      |
|                           | 上記以外のかんきつ類果実                       | 果実全体                           |
| 仁果果実                      | 西洋なし、日本なし、マルメロ及びびりんご               | 花おち、しん及び果核の基部を除去したもの           |
|                           | びわ                                 | 果核、果皮及び種子を除去したもの               |
| 熱帯産果実                     | アボカド、マンゴー                          | 種子を除去したもの                      |
|                           | キウイ                                | 果皮を除去したもの                      |
|                           | グアバ                                | へたを除去したもの                      |
|                           | なつめやし                              | へた及び種子を除去したもの                  |
|                           | パイナップル                             | 冠芽を除去したもの                      |
|                           | パッションフルーツ及びパイヤ                     | 果実全体                           |
| ベリー類果実                    | バナナ                                | 花柄部を除去したもの                     |
|                           | いちご、グランベリー、ハックルベリー、ブラックベリー及びブルーベリー | へたを除去したもの                      |
|                           | ラズベリー                              | 果実全体                           |
|                           | 上記以外ベリー類果実                         | へたを除去したもの                      |
| かき                        |                                    | へた及び種子を除去したもの                  |
| すいか、まくわうり及びびろん類果実(マスキメロン) |                                    | 果皮を除去したもの                      |
| ぶどう                       |                                    | 果核を除去したもの                      |
| 上記以外の果実(さくら、スターフルーツ、ドリアン) |                                    | 可食部                            |



図 1 レモン



図 2 みかん

粉碎容器を用いて、ドライアイスと共に検体が均一になるまで粉碎した。

### 2.5 水分定量

各処理法により均一化した試料をそれぞれアルミカップに 10g ずつ 3 併行で精秤し、水分定量用試料とした。

果実類の水分定量は、通常、減圧・乾燥助剤添加法 (70℃) で測定することとなっているが、現有機器の状況から今回の試験は常圧加熱乾燥法 (100℃) とした。

また、減量が続いた試料については、加熱による分解のためと推測されたため、減量幅が 10~25mg となった時点を目安にして前後の値を参照し、恒量とした。

### 2.6 粒度分布測定

水分定量と同様に、それぞれ 5g ずつ 3 併行で 50ml 容 PP 製チューブに精秤した試料に、精製水を加えて 10 倍希釈し、粒度分布測定用試料とした。

なお、試料は十分に転倒混和した後、測定装置に適正量追加し測定した。

## 3 結果及び考察

### 3.1 試料の均一化状態

各処理法による試料の均一化状態のうち、代表的な果実を図 1 から図 11 に示す。図の配置は、いずれも左がミキサー法、右が凍結粉碎法となっている。

レモンについて、ミキサー法では試料中に表皮や種子の一部が粉碎されず粒状となって残っている (図 1 参照)。

みかんについて、ミキサー法では短時間の放置で水分が下層に分離した。また、じょうのう膜及びびさのうの一部が粉碎されずに浮遊している (図 2 参照)。

りんごについて、ミキサー法では短時間の放置で酸化し変色した。また、表皮の一部が粉碎されずに残っている (図 3 参照)。

アボカドについて、ミキサー法では硬い外皮の一部が粉碎されずに残っており、さらに水分量が少なく脂質量が多い試料のため、攪拌も容易ではなく均一性に問題があった。凍結粉碎法では、外皮も含めすべて細かく粉碎



図 3 りんご



図 4 アボカド



図 5 パイナップル



図 6 パパイア

され均一な粉状となっている (図 4 参照)。

パイナップルについて、ミキサー法では外皮や果肉芯



図7 バナナ



図8 ブルーベリー



図9 マスクメロン



図10 さくら



図11 ドリアン

部分の繊維が粉碎されずに残っており、試料の均一性が保たれていなかった。凍結粉碎法では、一部外皮の混在も認められるが様に分布しており、すべて細かく粉碎され均一な粉状となっている(図5参照)。

パパイヤについて、ミキサー法では皮は均一に粉碎できているが、一部の黒い種が粉碎されずに不均一に分布している(図6参照)。

バナナについて、ミキサー法では短時間の放置で酸化し変色した。また、表皮の一部が粉碎されずに不均一に残っている(図7参照)。

ブルーベリーについて、ミキサー法では粉碎できなかった皮と種が混在している(図8参照)。

マスクメロンについて、ミキサー法では瞬く間に試料が水分と果肉部分に分離した。凍結粉碎法では、水分を含んだ試料も粉状で均一に粉碎されていた(図9参照)。

ざくらについて、ミキサー法では粉碎できなかった種子が大きさも不揃いで不均一に分布している。凍結粉碎法では、白い種子の混在が確認できるが大きさも分布状態も同様である(図10参照)。

ドリアンについて、ミキサー法ではクリームチーズ様の試料となり、粘性が高いため均一化されているか懸念された。凍結粉碎法では、試料の粘性や水分は全く問題なく、さらさらのパウダー状のものが得られた(図11参照)。

### 3.2 水分量の比較

各法における水分定量の結果を表2に示した。

前処理にミキサー法及び凍結粉碎法を用いた水分量を比較すると、バナナ、マスクメロン、ドリアンを除く果実ではほぼ同等の値を示し、すべての果実において3併行間のバラツキも非常に小さい値であった。これは、特にミキサー法による試料を分取する際にミキサーカップから直接分取せず、一旦ビーカーに小分けした後、良く攪拌しながら分取したため、均一なサンプリングができたと思われる。

また、凍結粉碎法では、粉碎後の試料がさらさらの粉末状で均一になっており簡便なサンプリングが可能であった。

一方、2法間の平均で有意差(P<0.01)が認められた果実は、パイナップル、パパイヤ、バナナ、かき、マスクメロン、ドリアンで、特に差が大きかったバナナ、マスクメロン、ドリアンの3品目では、凍結粉碎法で得た水分定量値の方が食品成分表による水分量と近い値となった。バナナは皮ごと、マスクメロンは果皮を除去、ドリアンは可食部とそれぞれ検体としての取扱いは異なる

表2 各法における水分定量結果

| 対象果実    | ミキサー法 (n=3)   | 凍結粉碎法 (n=3)   | 食品成分表による水分量 |
|---------|---------------|---------------|-------------|
| レモン     | 89.68 ± 0.14% | 89.13 ± 0.35% | 85.3 g      |
| みかん     | 90.30 ± 0.05% | 90.61 ± 0.11% | 86.9 g      |
| りんご     | 83.29 ± 0.05% | 83.71 ± 0.04% | 84.9 g      |
| アボカド    | 73.75 ± 0.18% | 74.50 ± 0.07% | 71.3 g      |
| マンゴー    | 83.87 ± 0.14% | 84.92 ± 0.05% | 82.0 g      |
| パイナップル* | 85.83 ± 0.09% | 85.04 ± 0.02% | 85.5 g      |
| パパイヤ*   | 87.03 ± 0.08% | 87.41 ± 0.07% | 89.2 g      |
| バナナ*    | 83.61 ± 0.21% | 79.91 ± 0.20% | 75.4 g      |
| いちご     | 89.51 ± 0.24% | 89.42 ± 0.02% | 90.0 g      |
| ブルーベリー  | 85.69 ± 0.12% | 84.76 ± 0.11% | 86.4 g      |
| かき*     | 83.98 ± 0.04% | 84.70 ± 0.12% | 83.1 g      |
| マスクメロン* | 96.15 ± 0.10% | 89.08 ± 0.03% | 87.8 g      |
| ぶどう     | 81.39 ± 0.05% | 81.68 ± 0.01% | 83.5 g      |
| ざくら     | 78.60 ± 0.15% | 79.39 ± 0.20% | 83.9 g      |
| スターフルーツ | 92.43 ± 0.12% | 92.12 ± 0.01% | 91.4 g      |
| ドリアン*   | 62.21 ± 0.29% | 65.46 ± 0.17% | 66.0 g      |

\*は平均値に有意差(P<0.01)が認められた果実

ものであったが、バナナはでんぷん質が多くもちり感を有しているため、粘度が高く攪拌されにくい。また、マスクメロンは果肉が柔らかく、ミキサーで容易に攪拌されるが、試料分取に駒込ピペットを使用したため、粉碎された果肉より水溶性成分を多く量りとした可能性が高い。ドリアンについては、他の果実に比べて炭水化物と脂質が多くクリーミーなため、ミキサー法による均一化でのサンプリングは特に困難であった。

### 3.3 粒度分布の比較

分散媒を水に、粒子屈折率を 1.576、スターラーの回転数 1,995rpm、超音波なしに設定し、粒子径範囲 0.02 ~ 2000  $\mu\text{m}$  の粒度分布を測定した。測定は 1 検体につき 3 回自動測定を行い、その平均をとる操作を 1 試料 3 検体分繰り返した。代表的な果実の粒度分布のチャートを図 12 から図 18 に示す。図の配置は、いずれも左がミキサー法、右が凍結粉碎法となっている。

両法の前処理によるかきの粒度分布は図 12 のようになり、他にレモン、りんご、スターフルーツ、ざくろも同様の分布を示した。また、いちご (図 13 参照) と同様の分布を示した他の果実として、みかん、マスクメロン、ぶどうがあった。

ミキサー法による前処理では、一部の果実で類似性の高い粒度分布が見られたが、特に皮や種子の一部が混在している試料において、様々なパターンを示したうえ試料間のバラツキも大きかった。一方、凍結粉碎法は、ドリアンを除きほぼ様な分布パターンとなった。

そこで、これらの分布データについて統計処理を行うため、得られた粒度分布の正規性の検定を行った。シャピロ=ウィルク検定の結果から、すべての粒度分布で正規性が棄却され、非正規分布であることを確認したため、以降の検定はノンパラメトリック検定を実施することとした。

各果実の前処理 2 法間の分布を比較するため、2 標本の位置だけでなく、分布の形にも違いがあるかどうか合わせて検出可能な 2 標本コルモゴロフ=スミルノフ検定を行った。有意水準 0.01 で有意な差を示した果実は、レモン、りんご、いちご、スターフルーツ、アボカド、マンゴー、ブルーベリーの 7 品目であり、P 値が 0.9 以上となったものは、みかん、マスクメロン、パパイヤであった。

次に、クラスカル=ウォリス検定により、ミキサー法で処理した 16 果実と凍結粉碎法で処理した 16 果実の平均順位の値をそれぞれ比較した。ミキサー法では、P 値は 0.0133 で  $P < 0.05$  となり有意の差が認められたため、Steel-Dwass 法による多重比較を行った。P 値が  $< 0.01$  となった組み合わせは、りんご-アボカド、P 値が  $< 0.05$  となった組み合わせは、いちご-アボカド、ざくろ-アボカド、スターフルーツ-アボカドであった。

一方、凍結粉碎法での P 値は 0.9610 であり、有意の差は認められなかった。また、この P 値は、ミキサー法

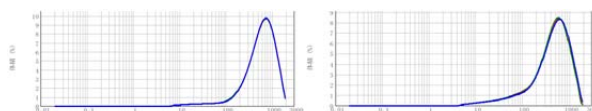


図 12 かきの粒度分布

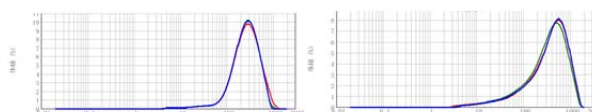


図 13 いちごの粒度分布

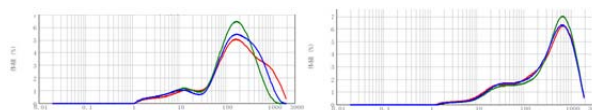


図 14 アボカドの粒度分布

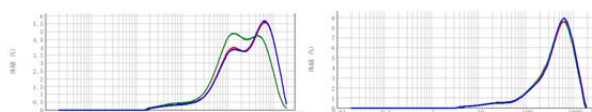


図 15 マンゴーの粒度分布

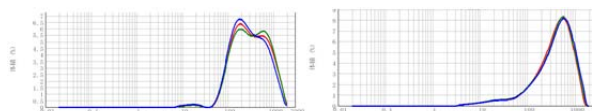


図 16 パイナップルの粒度分布

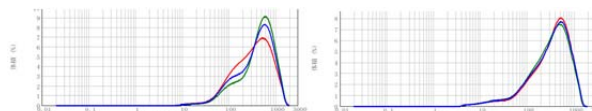


図 17 パパイヤの粒度分布

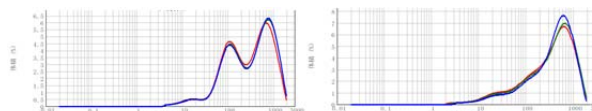


図 18 バナナの粒度分布

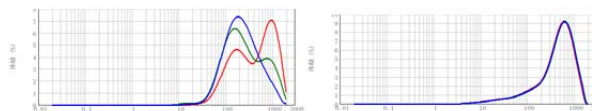


図 19 ブルーベリーの粒度分布

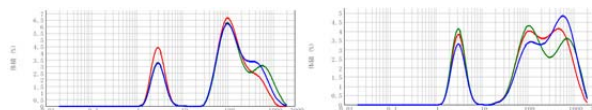


図 20 ドリアンの粒度分布

のアボカドを除いた 15 果実から求めた P 値 0.2400 よりはるかに大きな値であった。

以上の結果から、果実の種類に左右されることなく、均一な試料を得るための前処理には、凍結粉碎法が適していると考えられる。

次に、この粒度分布を果実ごとに3試料の平均値を求め、積算粒子量として表したグラフを図21から図24に示す。粒度分布がミキサー法で同様のパターンを示した果実類における相対粒子量のd50(メジアン径)は、271(いちご)~781(レモン) μm、様々な分布パターンを示した果実類では、明らかにパターンの異なるドリアンを除

き160(アボカド)~426(パパイヤ) μmであった。一方、凍結粉砕法ではそれぞれ365(ぶどう)~485(ざくろ) μm, 373(パパイヤ)~504(ブルーベリー) μmとなり、ミキサー法に比べて凍結粉砕法におけるd50の果物間格差は小さく、一様に均一化されていると考えられる。

#### 4 まとめ

食品中に残留する農薬等の分析において、重要なポイントとなる試料の粉砕均一化を検討した。

凍結粉砕法は、果実類の種類を問わず一様に均一化でき、硬い果皮や種子も残らず粉砕することができた。

また、凍結粉砕を行った場合、ジェネレーターによるホモジナイズが不要となり、シャフトの使い回しによるコンタミネーション防止や抽出時間の短縮を図ることができる。

以上の結果から、QuEChERS法をベースにしたSTQ法には、従来から当所で実施していたミキサー法より凍結粉砕法が有用であることが確認された。

#### 5 謝辞

本研究の実施にあたりご協力いただきました、宮城県産業技術総合センター四戸大希技師に感謝いたします。

本研究は、平成26年度一般財団法人日本公衆衛生協会特別研究助成金により実施しました。

#### 参考文献

- 1) 永井雄太郎：QuEChERSを見直してみよう,日本農薬学会誌,37(4),362-371(2012)
- 2) Michelangelo,A.et al.:Fast and Easy Multiresidue Method Employing Acetonitrile Extraction/Partitioning and “Dispersible Solid-Phase Extraction” for the Determination of Pesticide Residues.J.AOAC Int.,86,412-431(2003).
- 3) Steven J. Lehotay : Determination of Pesticide Residues in Foods by Acetonitrile Extraction and Partitioning with Magnesium Sulfate :Collaborative Study J.AOAC Int.,90,485-520( 2007).
- 4) BRITISH STANDARD BS EN 15662:2008 Foods of plant origin Determination of pesticide residues using GC-MS and/or LC-MS/MS following acetonitrile extraction/partitioning and clean-up by dispersive SPE-QuEChERS-method

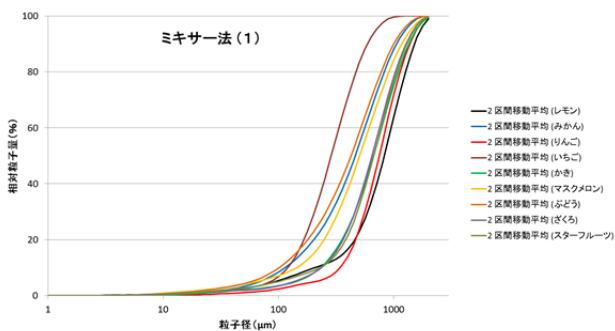


図21 ミキサー法で処理した試料の相対粒子量(1)

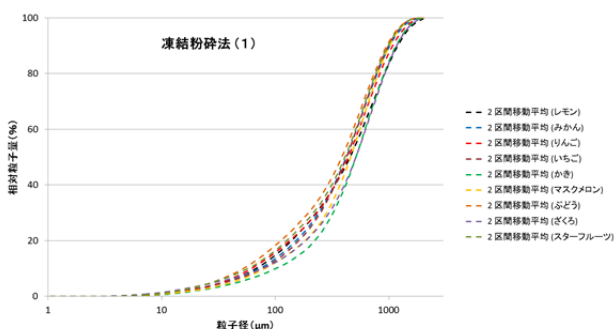


図22 凍結粉砕法で処理した試料の相対粒子量(1)

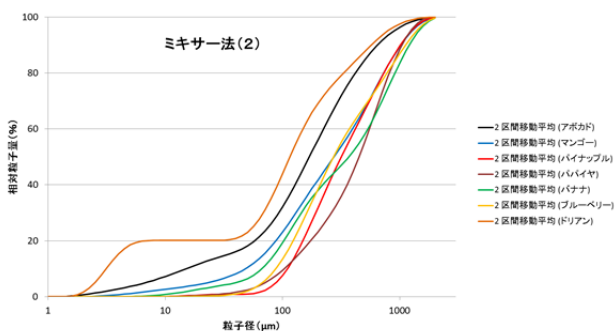


図23 ミキサー法で処理した試料の相対粒子量(2)

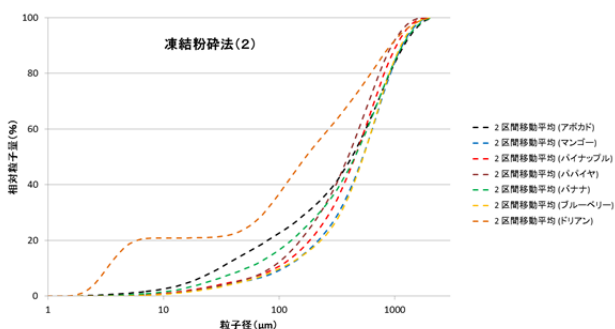


図24 ミキサー法で処理した試料の相対粒子量(2)